

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-149082

(P2001-149082A)

(43)公開日 平成13年6月5日(2001.6.5)

| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テマコード(参考) |
|--------------------------|-------|---------------|-------------------|
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | C 1 2 Q 1/68 | A 2 G 0 4 5 |
| C 1 2 Q 1/68 | | G 0 1 N 33/50 | P 4 B 0 2 4 |
| G 0 1 N 33/50 | | C 1 2 N 15/00 | Z N A A 4 B 0 6 3 |

審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 25 頁)

| | | | |
|-------------|-------------------------|---------|--|
| (21)出願番号 | 特願2000-1448(P2000-1448) | (71)出願人 | 000250100 湧永製薬株式会社 大阪府大阪市淀川区宮原4丁目5番36号 |
| (22)出願日 | 平成12年1月7日(2000.1.7) | (72)発明者 | 岡 孝 紀 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社内 |
| (31)優先権主張番号 | 特願平11-3446 | (72)発明者 | 山 根 明 男 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社内 |
| (32)優先日 | 平成11年1月8日(1999.1.8) | (72)発明者 | 田 中 孝 生 大阪府茨木市南春日丘2-7-11 |
| (33)優先権主張国 | 日本(J P) | (74)代理人 | 100064285 弁理士 佐藤 一雄 (外3名) |
| (31)優先権主張番号 | 特願平11-264052 | | |
| (32)優先日 | 平成11年9月17日(1999.9.17) | | |
| (33)優先権主張国 | 日本(J P) | | |

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C D 36変異遺伝子並びに脂質代謝異常により引き起こされる疾患の判定法および診断キット

(57)【要約】

【課題】 C D 3 6 変異遺伝子並びに脂質代謝異常により引き起こされる疾患の判定法および診断キットの提供。

【解決手段】 配列番号1～8のヌクレオチド配列を含んでなるC D 3 6 変異遺伝子。C D 3 6 遺伝子における変異を検出することにより脂質代謝異常により引き起こされる疾患の判定法。C D 3 6 遺伝子における変異の検出用試薬を含んでなる上記疾患の診断キット。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1～8から選択されるヌクレオチド配列を含んでなるCD36変異遺伝子。

【請求項2】 下記からなる群から選択される配列からなる、請求項1に記載のCD36変異遺伝子：CD36遺伝子配列において配列番号38のヌクレオチド配列部分が配列番号1、2、または3のヌクレオチド配列であるCD36遺伝子配列、CD36遺伝子配列において配列番号39のヌクレオチド配列部分が配列番号4のヌクレオチド配列であるCD36遺伝子配列、CD36遺伝子配列において配列番号41のヌクレオチド配列部分が配列番号5のヌクレオチド配列であるCD36遺伝子配列、CD36遺伝子配列において配列番号42のヌクレオチド配列部分が配列番号6または7のヌクレオチド配列であるCD36遺伝子配列およびCD36遺伝子配列において配列番号43のヌクレオチド配列部分が配列番号8のヌクレオチド配列であるCD36遺伝子配列。

【請求項3】 配列番号1～8から選択されるヌクレオチド配列またはその相補鎖あるいはそれらの変異部分を含んでなるヌクレオチド断片。

【請求項4】 変異部分が、変異を有する配列番号1～8から選択されるヌクレオチド配列の連続する少なくとも12ヌクレオチドからなるヌクレオチド断片である、請求項3に記載のヌクレオチド断片。

【請求項5】 CD36遺伝子における変異の検出用プローブである、請求項3または4に記載のヌクレオチド断片。

【請求項6】 請求項1に記載のCD36変異遺伝子またはその相補鎖の連続する少なくとも12ヌクレオチドからなるヌクレオチド断片を含んでなるCD36遺伝子における変異の検出用プライマー。

【請求項7】 請求項6に記載の二つのプライマーからなるプライマーペア。

【請求項8】 請求項7に記載のプライマーペアによりCD36遺伝子またはCD36変異遺伝子を増幅することにより得られたヌクレオチド断片。

【請求項9】 CD36遺伝子における変異を検出することを含んでなる、脂質代謝異常により引き起こされる疾患の判定法。

【請求項10】 CD36遺伝子における変異が、エクソン4、エクソン5、エクソン6、エクソン9、エクソン10、エクソン12、またはエクソン13における変異である、請求項9に記載の判定法。

【請求項11】 CD36遺伝子における変異が、配列番号1～8および10～11のいずれかに記載の配列により特定される変異である、請求項9に記載の判定法。

【請求項12】 脂質代謝異常により引き起こされる疾患が、心筋症、若年性突然死、および外科的手術における事故からなる群から選択される、請求項9に記載の判定法。

【請求項13】 CD36遺伝子における変異の検出が、請求項3に記載のヌクレオチド断片と被験者から単離した核酸試料とをハイブリダイズさせ、次いでハイブリダイゼーション複合体の存在を検出する工程を含んでなることを特徴とする、請求項9に記載の判定法。

【請求項14】 CD36遺伝子における変異の検出が、請求項7に記載のプライマーペアを用いて被験者から単離した核酸試料および標準核酸試料を増幅し、得られた増幅産物を相補鎖置換反応に付し、相補鎖置換の程度を検出する工程を含んでなることを特徴とする、請求項9に記載の判定法。

【請求項15】 CD36遺伝子における変異の検出用試薬を含んでなる、脂質代謝異常により引き起こされる疾患の診断キット。

【請求項16】 変異の検出用試薬が、請求項1に記載のCD36変異遺伝子またはその相補鎖の連続する少なくとも12ヌクレオチドからなるヌクレオチド断片を含んでなるものである、請求項15に記載の診断キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

発明の分野

本発明は、CD36変異遺伝子およびその用途に関し、更に詳細には、CD36変異遺伝子を用いた脂質代謝異常により引き起こされる疾患の判定法およびその疾患の診断キットに関する。

【0002】

背景技術

近年、心臓核医学的検索の進歩により、心筋脂肪代謝の臨床的評価が可能となり、心疾患における心筋脂肪代謝異常が検討されるようになった。特に肥大型心筋症症例で心筋への脂肪酸集積異常が数多く報告されているが、機序は不明であった。

【0003】 体内における血液循環の駆動装置である心臓は、平常状態においても莫大なエネルギーを必要とし、運動時・ストレス負荷時には更にその必要量が増加する。心筋におけるエネルギーの供給源の主たるものは長鎖脂肪酸であり、70～80%の心筋エネルギーが長鎖脂肪酸に由来するとされている。従って、心筋における長鎖脂肪酸代謝障害は、重篤な結果をもたらすものと考えられる。事実、長鎖脂肪酸代謝の最終段階、即ちミトコンドリアへの長鎖脂肪酸取り込み機構（carnitine shuttle）障害、あるいはβ酸化系に属する酵素異常により突然死を含む心疾患が生じることが知られている。

【0004】 長鎖脂肪酸の細胞内取り込み機構に関しては、諸説があり確定されていなかった。最近我々は心筋長鎖脂肪酸取り込み機構に関与する遺伝子を同定し、従来血小板の膜に発現する糖蛋白CD36であることを報告した（*BIO Clinica*, 12(14), 86-90(1997)）。

【0005】 これまで報告されているCD36変異遺伝

子としては、C 4 7 8 T置換：CD 3 6 遺伝子の4 7 8 番目（エキソン4）のシトシンがチミンに置換したもの（F. K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH (Stuttgart) 69 (5) 481-484 (1993)）、5 3 9 A C欠失：CD 3 6 遺伝子の5 3 9、5 4 0 番目（エキソン5）のアデニンとチミンが欠失したもの（Blood, 83 (12), 3545-3552 (1994)）、1 1 5 9 A挿入：CD 3 6 遺伝子の1 1 5 9 番目（エキソン10）にアデニンが挿入されたもの（Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 16 (8), 1026-1032）等がある。

【0006】しかし、これらのCD 3 6 変異遺伝子と脂質代謝異常により引き起こされる疾患との関係およびこれら以外のCD 3 6 変異遺伝子の存在は確認されていない。

【0007】

【発明の概要】本発明者らは、心臓に病歴のある人および疑いのある人のうち、脂肪酸の取り込みが欠落していた41検体について、フローサイトメトリー（flow cytometry）で血小板、および単球におけるCD 3 6 タンパクの発現を調べた。その結果、すべての例で血小板および単球ともCD 3 6 タンパクを発現していないことを見出した。

【0008】本発明者らは、更にこれら41検体につき染色体DNAを調製し、そのエキソン全領域に関して遺伝子変異の解析を行った。また、重症心不全に陥った27名の心筋症患者に対してバチスタ手術（収縮しなくなった心筋を一部切り取る手術）によって切除した組織から染色体DNAを精製し、CD 3 6 遺伝子変異の検出を試みた。その結果、従来知られているエキソン4、エキソン5、およびエキソン10における変異のほかに、エキソン6、エキソン9、エキソン12、およびエキソン13に新たな変異が存在することを見出した。また、本発明者らは、エキソン6、エキソン9、およびエキソン13に存在する変異のみならず、エキソン5に存在する新たな変異をも特定した。

【0009】本発明は、CD 3 6 変異遺伝子並びに脂質代謝異常により引き起こされる疾患の判定法および診断キットの提供をその目的とする。本発明はまた、脂質代謝異常の検出法の提供をその目的とする。

【0010】本発明によれば、配列番号1～8から選択されるヌクレオチド配列を含んでなるCD 3 6 変異遺伝子が提供される。

【0011】本発明によれば、また、配列番号1～8から選択されるヌクレオチド配列またはその変異部分を含んでなるヌクレオチド断片が提供される。

【0012】本発明によれば、CD 3 6 遺伝子における変異を検出することを含んでなる脂質代謝異常により引き起こされる疾患の判定法が提供される。

【0013】本発明によれば、CD 3 6 遺伝子における変異の検出用試薬を含んでなる脂質代謝異常により引き

起こされる疾患の診断キットが提供される。

【0014】本発明によれば、CD 3 6 遺伝子における変異を検出することを含んでなる脂質代謝異常の検出法が提供される。

【0015】

【発明の具体的説明】本明細書において「変異」とは、欠失、置換、および挿入を意味する。

【0016】本明細書において「遺伝子変異」とは、片方のアレルに変異が存在する場合のみならず、両アレルに変異が存在する場合も含む。

【0017】本明細書において「塩基番号Xにおける挿入」とは、塩基番号X-1番と塩基番号X番との間に塩基が挿入されることを意味する。

【0018】本明細書において「CD 3 6 遺伝子の塩基番号」というときは、CD 3 6 のcDNA配列、すなわち、配列番号9のヌクレオチド配列、の塩基番号に従うものとする。

【0019】本発明によるCD 3 6 変異遺伝子は配列番号1～8に記載されるヌクレオチド断片を含んでなる。

【0020】本発明によるCD 3 6 変異遺伝子は、具体的には、CD 3 6 遺伝子配列において配列番号38のヌクレオチド配列部分（エキソン13をコードする配列およびそれに隣接するイントロン部分を含む）が配列番号1、2、または3のヌクレオチド配列であるCD 3 6 遺伝子配列、CD 3 6 遺伝子配列において配列番号39のヌクレオチド配列部分（エキソン12をコードする配列およびそれに隣接するイントロン部分を含む）が配列番号4のヌクレオチド配列であるCD 3 6 遺伝子配列、CD 3 6 遺伝子配列において配列番号41のヌクレオチド配列部分（エキソン9をコードする配列およびそれに隣接するイントロン部分を含む）が配列番号5のヌクレオチド配列であるCD 3 6 遺伝子配列、CD 3 6 遺伝子配列において配列番号42のヌクレオチド配列部分（エキソン6をコードする配列およびそれに隣接するイントロン部分を含む）が配列番号6または7のヌクレオチド配列であるCD 3 6 遺伝子配列およびCD 3 6 遺伝子配列において配列番号43のヌクレオチド配列部分（エキソン5をコードする配列およびそれに隣接するイントロン部分を含む）が配列番号8のヌクレオチド配列であるCD 3 6 遺伝子配列であることができる。

【0021】本明細書において配列番号1～8および10～12のヌクレオチド配列の変異部分とは、置換、欠失、または挿入を有する部分を含む連続した少なくとも12ヌクレオチド（例えば、12～40ヌクレオチド）、好ましくは少なくとも20ヌクレオチド（例えば、20～40ヌクレオチド）、からなる。

【0022】「CD 3 6 遺伝子」とはJ. Biol. Chem., Vol. 269, No. 29, 18985-18991 (1994)に開示されるCD 3 6 遺伝子を意味する。「CD 3 6 変異遺伝子」とは変異を有するCD 3 6 遺伝子をいう。

【0023】CD36遺伝子のcDNA配列は配列番号9に記載される。配列番号9のヌクレオチド配列におけるエクソンの存在位置は次の通りである。エクソン1：1～27、エクソン2：28～121、エクソン3：122～330、エクソン4：331～491、エクソン5：492～639、エクソン6：640～819、エクソン7：820～911、エクソン8：912～958、エクソン9：959～1028、エクソン10：1029～1216、エクソン11：1217～1335、エクソン12：1336～1409、エクソン13：1410～1464、エクソン14：1465～終始コドンを含む領域まで。

【0024】背景技術において言及した従来から知られるCD36変異遺伝子の変異部分は、配列番号10～12に記載される。

【0025】正常なCD36遺伝子のエクソン13、エクソン12、エクソン10、エクソン9、エクソン6、エクソン5、およびエクソン4をコードする配列をそれぞれ含むヌクレオチド配列は、配列番号38、39、40、41、42、43、および44に記載される。

【0026】CD36変異遺伝子およびその変異部分は後述するように、CD36遺伝子の変異の検出、脂質代謝異常の検出、更には、脂質代謝異常により引き起こさ

れた疾患の診断および判定、に有用である。

【0027】本明細書において「CD36遺伝子における変異」は、エクソン4、エクソン5、エクソン6、エクソン9、エクソン10、エクソン12、およびエクソン13を含む領域における変異であることができる。

「CD36遺伝子における変異」は、これらのエクソン内における欠失、置換、および挿入や、エクソンからイントロンあるいはイントロンからエクソンにかけての欠失および置換のみならず、イントロン内部の5'コントロール領域や3'コントロール領域における欠失、置換および挿入も意味する。「CD36遺伝子における変異」は、フレームシフトを生じさせる変異や、アミノ酸の欠失、置換または挿入を生じさせる変異であることができる。

【0028】エクソン5の変異の例としては、(1)CD36遺伝子の塩基番号620における塩基の置換、欠失または挿入が挙げられる。好ましくは、CD36遺伝子の塩基番号620における塩基(チミン)のシトシンへの置換(下記参照)であることができる。CD36遺伝子正常配列(配列番号43)：ex05、変異遺伝子配列(配列番号8)：t620c。下線はエクソン5を示す。

【0029】

```
ex05    TTTGAATTTTGTCTTACTGCTGTTCTTTAGAGTTCGTTTCTAGCCAAGGAAAATGTAAC 60
t620c   TTTGAATTTTGTCTTACTGCTGTTCTTTAGAGTTCGTTTCTAGCCAAGGAAAATGTAAC 60
*****
ex05    CCAGGACGCTGAGGACAACACAGTCTCTTCTGCAGCCCAATGGTGCCATCTTCGAACC 120
t620c   CCAGGACGCTGAGGACAACACAGTCTCTTCTGCAGCCCAATGGTGCCATCTTCGAACC 120
*****
ex05    TTCACTATCAGTTGGAACAGAGGCTGACAACCTTACAGTTCTCAATCTGGCTGTGGCAGT 180
t620c   TTCACTATCAGTTGGAACAGAGGCTGACAACCTTACAGTTCTCAATCTGGCTGTGGCAGT 180
*****
ex05    GAGTAGACAAACAACAAAGTTATCTATT 208
t620c   GAGTAGACAAACAACAAAGTTATCTATT 208
*****
```

【0030】エクソン6の変異の例としては、(2)CD36遺伝子の塩基番号716における塩基の置換、欠失または挿入、および(3)CD36遺伝子の塩基番号770における塩基の置換、欠失または挿入が挙げられる。

【0031】変異(2)は、好ましくは、CD36遺伝

子の塩基番号716におけるチミンからグアニンへの置換(下記参照)であることができる。CD36遺伝子正常配列(配列番号42)：ex06、変異遺伝子配列(配列番号7)：t716g。下線はエクソン6を示す。

【0032】

```
ex06    TTGTCTTAAACAGTGACITTTGTTTTGTAGGCTGCATCCCATATCTATCAAAATCAATTT 60
t716g   TTGTCTTAAACAGTGACITTTGTTTTGTAGGCTGCATCCCATATCTATCAAAATCAATTT 60
*****
ex06    GTTCAAATGATCCTCAATTCACCTTATTAACAAGTCAAAATCTTCTATGTTCCAAGTCAGA 120
t716g   GTTCAAATGATCCTCAATTCACCTTATTAACAAGTCAAAATCTTCTAGTTCCAAGTCAGA 120
*****
ex06    ACTTTGAGAGAACTGTTATGGGGCTATAGGGATCCATTTTGTAGTTGGTCCGTACCCCT 180
t716g   ACTTTGAGAGAACTGTTATGGGGCTATAGGGATCCATTTTGTAGTTGGTCCGTACCCCT 180
*****
```

```

ex06   GTTACTACCACAGTTGGTCTGTTTATCCTGTAAGTACCAAATATGAATGGCAATATTAT 240
t716g  GTTACTACCACAGTTGGTCTGTTTATCCTGTAAGTACCAAATATGAATGGCAATATTAT 240
*****

```

【0033】変異(3)は、好ましくは、CD36遺伝子の塩基番号770へのフレームシフトを生じさせる塩基の挿入、更に好ましくは、CD36遺伝子の塩基番号770へのチミンの挿入(下記参照)、であることがで

きる。CD36遺伝子正常配列(配列番号42): ex06、変異遺伝子配列(配列番号6): 770ins。下線はエキソン6を示す。

【0034】

```

ex06   TTGCTTAAACAGTGACTTTGTTTTGTAGGCTGCATCCCATATCTATCAAAATCAATTT 60
770ins TTGCTTAAACAGTGACTTTGTTTTGTAGGCTGCATCCCATATCTATCAAAATCAATTT 60
*****
ex06   GTTCAAATGATCCTCAATTCACCTTATTAACAAGTCAAAATCTTCTATGTTCCAAGTCAGA 120
770ins GTTCAAATGATCCTCAATTCACCTTATTAACAAGTCAAAATCTTCTATGTTCCAAGTCAGA 120
*****
ex06   ACTTTGAGAGAACTGTTATGGGGCTATAGGGATCCATTTT-GAGTTGGTTCCGTACCC 179
770ins ACTTTGAGAGAACTGTTATGGGGCTATAGGGATCCATTTTGTAGTTGGTTCCGTACCC 180
*****
ex06   TGTACTACCACAGTTGGTCTGTTTATCCTGTAAGTACCAAATATGAATGGCAATATTA 239
770ins TGTACTACCACAGTTGGTCTGTTTATCCTGTAAGTACCAAATATGAATGGCAATATTA 240
*****
ex06   T 240
770ins T 241
*

```

【0035】エキソン9の変異の例としては、(4) CD36遺伝子の塩基番号970における塩基の置換、欠失または挿入が挙げられる。好ましくは、CD36遺伝子の塩基番号970におけるチミンのシトシンへの置換

(下記参照)であることができる。CD36遺伝子正常配列(配列番号41): ex09、変異遺伝子配列(配列番号5): t970c。下線はエキソン9を示す。

【0036】

```

ex09   CTAATCATTTGCCACTCGATTTTAAACAGATGCAGCCTCATTCCACCTTTTGTGAGA 60
t970c  CTAATCATTTGCCACTCGATTTTAAACAGATGCAGCCTCATTCCACCTTTTGTGAGA 60
*****
ex09   AAAGCCAGGTATTGCAGTTCTTTTCTCTGATATTGCAGGTAAGACAGATACTGAAGTA 120
t970c  AAAGCCAGGTATTGCAGTTCTTTTCTCTGATATTGCAGGTAAGACAGATACTGAAGTA 120
*****
ex09   TAAGTATGCT 130
t970c  TAAGTATGCT 130
*****

```

【0037】エキソン12の変異の例としては、(5) CD36遺伝子のエキソン12の5'側上流第5番目の塩基(イントロン部分に存在)からエキソン12の第2番目の塩基までの塩基部分(TTTAGAT)またはその塩基部分の一部の欠失であって、スプライシングの正常な進行を妨げるような欠失、すなわち発現タンパク質からエキソン12が完全に欠落するような欠失、であることが

できる。CD36遺伝子のエキソン12の5'側上流第5番目の塩基(イントロン内部に存在)からエキソン12の第2番目の塩基までの塩基部分(TTTAGAT)の欠失は下記の通りである。CD36遺伝子正常配列(配列番号39): ex12、変異遺伝子配列(配列番号4): ex12 skip。下線はエキソン12を示す。

【0038】

```

ex12   TTGGTAATTATTTAGTTGTTCTCTTTTATAGATAACTGGATTCACTTTACAATTTGCAAAA 60
ex12skipTTGGTAATTATTTAGTTGTTCTCTT-----AACTGGATTCACTTTACAATTTGCAAAA 53
*****
ex12   CGGCTGCAGGTCAACCTATTGGTCAAGCCATCAGAAAAAATTCAGTGAGTCTCTTGAAAA 120
ex12skipCGGCTGCAGGTCAACCTATTGGTCAAGCCATCAGAAAAAATTCAGTGAGTCTCTTGAAAA 113
*****
ex12   TGGTTATTTTGATA 134
ex12skipTGGTTATTTTGATA 127

```

【0039】エキソン13の変異の例としては、(6) CD36遺伝子の塩基番号1438～1449の塩基を含む塩基部分または塩基番号1438～1449の一部の欠失、(7) CD36遺伝子の塩基番号1457における塩基の置換、欠失または挿入、(8) CD36遺伝子のエキソン13の5'側上流第8番目の塩基(イントロン部分に存在)からエキソン13の第2番目の塩基までの塩基部分またはその塩基部分の一部の欠失が挙げられる。

```
ex13  AGTTTATATGTTTCATAATTATTTCAACGTATATTACAGAGTATTAAGAATCTGAAGAG 60
del12  AGTTTATATGTTTCATAATTATTTCAACGTATATTACAGAGTATTAAGAATCTGAAGAG 60
*****
ex13  GAACTATATTGTCCTATTCTTTGGCTTAATGAGGTTTGTATTGTCAGCTGTTAGTCATT 120
del12  GAACTAT-----CTTTGGCTTAATGAGGTTTGTATTGTCAGCTGTTAGTCATT 108
*****
ex13  AAAA 124
del12  AAAA 112
****
```

【0043】変異(7)は、好ましくは、CD36遺伝子の塩基番号1457へのフレームシフトを生じさせる塩基の挿入、更に好ましくは、塩基番号1457へのttaagaatctgaagaggaactatatgtgcctattctttggcの挿入(すなわち、塩基番号1414～1456の塩基部分の重複)、であることができる。

```
ex13  AGTTTATATGTTTCATAATTATTTCAACGTATATTACAGAGTATTAAGAATCTGAAGAG 60
dup43  AGTTTATATGTTTCATAATTATTTCAACGTATATTACAGAGTATTAAGAATCTGAAGAG 60
*****
ex13  GAACTATATTGTCCTATTCTTTGGC----- 90
dup43  GAACTATATTGTCCTATTCTTTGGCTTAAGAATCTGAAGAGGAAGTATATTGTCCTA 120
*****
ex13  -----TTAATGAGGTTTGTATTGTCAGCTGTTAGTCATTAATA 124
dup43  TTCTTTGGCTTAATGAGGTTTGTATTGTCAGCTGTTAGTCATTAATA 167
*****
```

【0046】変異(8)は、CD36遺伝子のエキソン13の5'側上流第8番目の塩基(イントロン部分に存在)からエキソン13の第2番目の塩基までの塩基部分(tattacagag)の欠失またはその塩基部分の一部の欠失であって、スプライシングの正常な進行を妨げるような欠失、すなわち、発現タンパク質からエキソン13が完全に欠落するような欠失、であることができる。

```
ex13  AGTTTATATGTTTCATAATTATTTCAACGTATATTACAGAGTATTAAGAATCTGAAGAG 60
del10  AGTTTATATGTTTCATAATTATTTCAACGTA-----TATTAAAGAATCTGAAGAG 50
*****
ex13  GAACTATATTGTCCTATTCTTTGGCTTAATGAGGTTTGTATTGTCAGCTGTTAGTCATT 120
del10  GAACTATATTGTCCTATTCTTTGGCTTAATGAGGTTTGTATTGTCAGCTGTTAGTCATT 110
*****
ex13  AAAA 124
del10  AAAA 114
****
```

【0040】変異(6)は、CD36遺伝子の塩基番号1438～1449からなる塩基部分(attgtgcctatt)またはその一部の欠失であることができる。

【0041】CD36遺伝子の塩基番号1438～1449からなる塩基部分(attgtgcctatt)の欠失は以下の通りである。CD36遺伝子正常配列(配列番号38): ex13、変異遺伝子配列(配列番号1): del12。下線はエキソン13を示す。

【0042】

【0044】CD36遺伝子の塩基番号1414～1456の塩基部分の重複は下記の通りである。CD36遺伝子正常配列(配列番号38): ex13、変異遺伝子配列(配列番号2): dup43。下線はエキソン13を示す。

【0045】

【0047】CD36遺伝子のエキソン13の5'側上流第8番目の塩基(イントロン部分に存在)からエキソン13の第2番目の塩基までの塩基部分(tattacagag)の欠失は記の通りである。CD36遺伝子正常配列(配列番号38): ex13、変異遺伝子配列: del10(配列番号3)。下線はエキソン13を示す。

【0048】

【0049】エキソン4における変異の例としては、
 (9) CD36遺伝子の塩基番号478における塩基の置換、欠失または挿入、好ましくはCのAへの置換(下記参照)、が挙げられる。

```
ex04 CATAACCCAACTTATTTTCTTTCCATAGCAAGTTGCTCGAAGAAGGTACAATTGCT 60
478CT CATAACCCAACTTATTTTCTTTCCATAGCAAGTTGCTCGAAGAAGGTACAATTGCT 60
*****
ex04 TTTAAAAATTGGGTAAAACAGGCACAGAAGTTTACAGACAGTTTGGATCTTTGATGTG 120
478CT TTTAAAAATTGGGTAAAACAGGCACAGAAGTTTACAGACAGTTTGGATCTTTGATGTG 120
*****
ex04 CAAATCCACAGGAAGTGATGATGAACAGCAGCAACATTCAAGTTAAGCAAAGAGGTCCT 180
478CT CAAATCCACAGGAAGTGATGATGAACAGCAGCAACATTCAAGTTAAGCAAAGAGGTTCT 180
***** **
ex04 TATACGTACAGGTGAGTGAGTGCCCAAAATATGAGACACT 221
478CT TATACGTACAGGTGAGTGAGTGCCCAAAATATGAGACACT 221
*****
```

【0050】CD36遺伝子正常配列(配列番号44): ex04、変異遺伝子配列: 478CT(配列番号10)。下線はエキソン4を示す。

【0051】

【0052】エキソン5における変異の例としては、更に、(10) CD36遺伝子の塩基番号539および/または540における塩基の置換、欠失または挿入、好ましくは、539および540におけるACの欠失(下記参照)、が挙げられる。

```
ex05 TTTGAATTTGTTTACTGCTGTTTCTTTAGAGTTCGTTTCTAGCCAAGGAAAATGTAAC 60
539ACdelTTTGAATTTGTTTACTGCTGTTTCTTTAGAGTTCGTTTCTAGCCAAGGAAAATGTAAC 60
*****
ex05 CCAGGACGCTGAGGACAACAGTCTCTTCTGCAGCCCAATGGTGCCATCTCGAACC 120
539ACdelCCAGGACGCTGAGGACA—ACAGTCTCTTCTGCAGCCCAATGGTGCCATCTCGAACC 118
*****
ex05 TTTCACTATCAGTTGGAACAGAGGCTGACAACCTCACAGTTCTCAATCTGGCTGTGGCAGT 180
539ACdelTTTCACTATCAGTTGGAACAGAGGCTGACAACCTCACAGTTCTCAATCTGGCTGTGGCAGT 178
*****
ex05 GAGTAGACAAACAACAAGTTATCTATT 208
539ACdelGAGTAGACAAACAACAAGTTATCTATT 206
*****
```

【0053】CD36遺伝子正常配列(配列番号43): ex05、変異遺伝子配列: 539ACdel(配列番号11)。下線はエキソン5を示す。

【0054】

【0055】エキソン10における変異の例としては、(11) CD36遺伝子の塩基番号1159における塩基の置換、欠失または挿入、好ましくは、Aの挿入(下記参照)、が挙げられる。

```
ex10 TGAATGCAGCTCTTTTCTCTGTATTTAGGTCAATCTATGCTGTATTTGAATCCGACG 60
1159AinsTGAATGCAGCTCTTTTCTCTGTATTTAGGTCAATCTATGCTGTATTTGAATCCGACG 60
*****
ex10 TTAATCTGAAAGGAATCCCTGTGTATAGATTGTTCTTCCATCCAAGGCCTTTGCCTCTC 120
1159AinsTTAATCTGAAAGGAATCCCTGTGTATAGATTGTTCTTCCATCCAAGGCCTTTGCCTCTC 120
*****
ex10 CAGTTGAAAACCCAGACAACATTGTTTCTGCACAGAAAAATTATCTC—AAAAAATTGT 179
1159AinsCAGTTGAAAACCCAGACAACATTGTTTCTGCACAGAAAAATTATCTCAAAAAAATTGT 180
*****
ex10 ACATCATATGGTGTGCTAGACATCAGCAAATGCAAAGAAGGTGAGTAAATAACCTCAGTA 239
1159AinsACATCATATGGTGTGCTAGACATCAGCAAATGCAAAGAAGGTGAGTAAATAACCTCAGTA 240
*****
ex10 GCACAGTCCAT 250
```

【0056】CD36遺伝子正常配列(配列番号40): ex10、変異遺伝子配列: 1159Ains(配列番号12)。下線はエキソン10を示す。

【0057】

【0058】本明細書において「CD36遺伝子における変異の検出用試薬」とは、CD36遺伝子における特定または不特定変異の検出に必要とされるプライマー、プライマーペア、プローブ、制限酵素、マクサムギルバート法やチェインターミネーター法のような塩基配列決定法に用いられる試薬、並びにヌクレオチド断片の増幅用鋳型としてのCD36遺伝子やCD36変異遺伝子を用い、本発明による脂質代謝異常により引き起こされる疾患またはその発症可能性の判定法に使用される。

【0059】CD36遺伝子における変異の検出に用いられるプライマーおよびプローブは、本発明によるCD36変異遺伝子またはその相補鎖、好ましくは、配列番号1～8および10～12から選択されるヌクレオチド配列またはその相補鎖、の連続する少なくとも12（例えば、12～20）、好ましくは少なくとも20（例えば、20～40）、の塩基からなるヌクレオチド断片、であることができる。

【0060】CD36遺伝子における変異の検出に用いられるプライマーとしては、各エキソンの5'側上流部分および3'側下流部分並びにそれらの相補鎖が挙げられるがこれらに限定されるものではない。好ましくは、配列番号13～37に記載されるヌクレオチド断片およびその相補鎖であることができる。

【0061】CD36遺伝子における変異の検出に用いられるプローブとしては、配列番号1～8および10～12に記載されるヌクレオチド断片およびその相補鎖から選ぶことができる。プローブは慣用技術に従って標識されていてもよい。

【0062】本発明によるプライマーペアはCD36遺伝子における変異の検出に用いられる二つのプライマーからなる。プライマーペアは、CD36遺伝子あるいはCD36変異遺伝子の少なくとも12（例えば、12～20）、好ましくは少なくとも20（例えば、20～40）、のヌクレオチドからなるヌクレオチド断片と、CD36遺伝子あるいはCD36変異遺伝子の相補鎖の少なくとも12（例えば、12～40）、好ましくは少なくとも20（例えば、20～40）、のヌクレオチドからなるヌクレオチド断片とからなることができる。プライマーペアの例としては、配列番号13および14のヌクレオチド配列、配列番号15および16のヌクレオチド配列、配列番号17および18のヌクレオチド配列、配列番号19および20のヌクレオチド配列、配列番号21および22のヌクレオチド配列、配列番号23および24のヌクレオチド配列、配列番号25および26のヌクレオチド配列、配列番号27および28のヌクレオチド配列、配列番号29および30のヌクレオチド配列、配列番号31または32および配列番号33のヌクレオチド配列、配列番号34および35のヌクレオチド

配列、並びに配列番号36および37のヌクレオチド配列が挙げられる。

【0063】本発明においては、(1)～(11)から選択される2以上の変異の検出を組み合わせることで、本発明による判定法の精度を向上させることができる。

【0064】従って、(1)～(11)から選択される2以上の変異の検出を組み合わせることで、本発明による判定法および診断キットの範囲内であることはいふまでもない。

【0065】脂質代謝異常により引き起こされる疾患の診断および判定並びに脂質代謝異常の検出は、CD36遺伝子における変異を検出することにより実施できる。

【0066】CD36遺伝子における変異の存在は脂質代謝異常により引き起こされる疾患のかかり易さを示す。

【0067】CD36遺伝子における変異の検出は、配列番号1～8および10～12から選択されるヌクレオチド配列またはその相補鎖あるいはそれらの変異部分を含んでなるヌクレオチドプローブと、被験者から単離した核酸試料とをハイブリダイズさせ、次いでハイブリダイゼーション複合体の存在を検出することにより実施してもよい。ハイブリダイゼーション複合体の存在は変異の存在を示す。ハイブリダイゼーション複合体は、固定化されたプローブ上に目的核酸を捕獲し、標識核酸試料の存在を検出することにより検出できる。ハイブリダイゼーション複合体は、また、PCR法等による増幅産物の存在を検出することにより検出してもよい。具体的には、ヌクレオチドプローブと、もう一つの他のCD36遺伝子のヌクレオチド断片とを準備し、これらをプライマーペアとして用いて試料核酸をPCR法等により増幅する。増幅産物の存在は変異の存在を示す。

【0068】CD36遺伝子における変異の検出は、また、被験者から単離した核酸試料および標準核酸試料を、CD36変異遺伝子またはその相補鎖の連続する少なくとも12（例えば、12～20）、好ましくは少なくとも20（例えば、20～40）、のヌクレオチドからなるヌクレオチド断片を含んでなるCD36遺伝子における変異の検出用プライマーペアを用いてPCR法等により増幅し、得られた増幅産物を相補鎖置換が生じるように、熱変性させた後、冷却し、相補鎖置換の程度を検出することにより実施してもよい。野生型由来の標準核酸試料の相補鎖置換は野生型遺伝子の存在を示し、変異型由来の標準核酸試料の相補鎖置換は変異型遺伝子の存在を示す。疾患のより具体的な診断および判定は後述する。

【0069】脂質代謝異常により引き起こされる疾患の診断および判定は、CD36遺伝子における不特定変異

あるいは特定変異を検出することにより実施できる。

【0070】不特定変異の検出は、CD36遺伝子全体にわたって変異遺伝子の解析が可能である。CD36遺伝子において変異が存在すると評価されたサンプルは、脂質代謝異常により引き起こされる疾患の患者であると、あるいはその発症可能性があるとして診断または判定することができる。

【0071】特定変異の検出は、いくつかの特定変異の有無を解析するだけで十分な検出率を期待できる場合や、ある特定変異と病状とに著しい相関がある場合などにおいては、必要な種類の特定変異を検出することで十分な診断または判定をすることができる。従って、変異(1)～(11)が存在すると評価されたサンプルは、脂質代謝異常により引き起こされる疾患患者であると、あるいはその発症可能性があるとして診断または判定することができる。

【0072】＜不特定変異の検出＞不特定変異を検出する方法としては、PCR-SSCP、PCR-DGGE、RNaseによるミスマッチ切断法、PCR-PHFA法(1)等が挙げられる。本発明において用いたPCR-PHFA法(1)による不特定変異検出法(米国特許第5688643号)を以下説明する。

【0073】PCR-PHFA法(1)では野生型の配列を有する標的遺伝子を、その領域を特異的に増幅することが可能な非標識プライマーでPCR増幅して非標識標準DNAを得る。一方、検体の同じ領域を同じ配列の標識プライマーで増幅することによって両末端に標識を有する標識試料DNAを調製する。なお、この標識プライマーの一方は固相に吸着可能な標識を有し、他方のプライマーは検出可能な標識を有する。

【0074】標識試料DNAに対して大過剰量(例えば10～30倍量)の非標識標準DNAを混和し、熱変性が生じるに十分な高温(例えば98℃)で10分程度保温した後、アニーリングが完結するのに十分な低温(例えば70℃)まで緩やかな温度勾配(例えば1℃/3～10分)をかけて徐々に冷却する。この操作によって検体が野生型のhomozygoteの場合には標識試料DNAと非標識標準DNAが完全に同じ配列をもつために、標識DNAと非標識DNAの間で相補鎖置換が生じ、もとの両末端に標識をもつ分子は非標識DNAの過剰度に応じて数学的な確率で再構成されるに過ぎない。一方、検体が標的領域について、両方のアレルとも野生型と異なる配列をもつ場合には、温度勾配の段階でわずかな配列の差が認識され、もとの両末端に標識をもつ分子が効率よく再構成される。また、検体が片方は野生型のアレルをもち、他方は野生型と異なる配列を有する場合には、野生型のアレルに由来する標識試料DNAはあまり再構成されず、野生型と異なる配列のアレルに由来する標識DNAは効率よく再構成されるために、上述した2例の中間程度の効率で標識DNAが再構成される。

【0075】DNAは固相に吸着可能なビオチンで標識することができる。標識DNAはストレプトアビジンを固定化したマイクロプレートにて捕捉できる。また、検出可能な標識としてDNP(ジニトロフェニル基)を使用し、アルカリ性フォスファターゼ標識抗DNP抗体を結合させ、pNPP(p-ニトロフェニルホスフェート)を発色基質として黄色の発色により検出することもできる。この系においては、ストレプトアビジンを固定化したマイクロプレートにアルカリ性フォスファターゼ標識抗DNP抗体を分注しておき、これに上述の条件で標識試料DNAを非標識標準DNAを混和後アニーリングさせた溶液を加える。両末端標識DNAは一方の標識でマイクロプレートに吸着し、他方の標識にアルカリ性フォスファターゼ標識抗DNP抗体が結合する。洗浄操作の後、発色基質であるpNPPを加えることにより発色させることができる。この発色の強さは固相上に存在する両末端標識DNAの量、即ち、両末端標識DNAが再構成された割合、に依存する。これによってもとの検体が両方とも野生型のアレルをもつか、片方は野生型、他方は野生型と異なる配列をもつか、或いは両方とも野生型と異なる配列をもつかを判定できる。

【0076】なお、野生型配列と野生型配列とは異なる配列がアニーリング中に区別される程度は各エクソンの鎖長、塩基配列によって異なるため、解析する領域ごとに適切なカットオフ値をもうけることによって判定が可能になる。

【0077】＜特定変異の検出＞特定変異遺伝子の検出する方法としては、ASO法、SSP法、LCR法、PHFA法(2)が挙げられる。本発明において使用したPHFA法(2)(WO98/02574号)について以下説明する。エクソン4のC478T変異、エクソン5の539AC欠失、エクソン10の1159A挿入の遺伝子についての特定変異の検出方法について説明する。

【0078】CD36遺伝子(野生型)の配列を有する染色体DNAをそのエクソン増幅用プライマーを用いてPCR増幅する。これをpT7Blue-T-Vectorに導入後、塩基配列を確認し野生型の配列を有するプラスミドを得る。一方、CD36変異遺伝子を有する染色体DNAを同じプライマーで増幅し、同ベクターに導入後、塩基配列を確認し、変異遺伝子を有するプラスミドを得る。

【0079】野生型および変異型のプラスミドを鋳型として、そのエクソン増幅用標識プライマー(配列はエクソン増幅用非標識プライマーと同じ)を用いて増幅し、野生型および変異型の標識標準DNAを得る。一方、試料DNAをエクソン増幅用非標識プライマーで増幅し、非標識試料DNAを調製する。

【0080】標識標準DNAに対して大過剰量(例えば10～30倍量)の非標識試料DNAを加え、上述した

不特定変異の検出の項と同様の操作により熱変性、アニーリングを行う。その結果、検体が標識標準DNAと同じ配列を有する場合には、その標識DNAが再構成される確率は数学的なものとなり、非標識DNAの過剰度に応じて低くなる。一方、検体が標識標準DNAと同じ配列を有しない場合には、もとの標識標準DNAが効率よく再構成される。この違いは上述した発色系によって検出され、それによって検体が特定変異遺伝子を有するか否かを判定する。ここで、解析するエクソンによってその鎖長、塩基配列が異なるために解析する領域ごとに適切なカットオフ値を設定することで判定が可能になる。

【0081】このようにして、不特定変異遺伝子の存在が明らかになったもののうち、該当するエクソンに未だ変異が報告されていないもの、および相当するエクソンの報告されている変異遺伝子と配列の異なるもの等については、新規変異遺伝子として塩基配列の確認を行い、新たな変異遺伝子として検出すべき特定変異遺伝子のグループに加え、更なる診断および判定に使用することができる。

【0082】本発明において、「脂質代謝異常により引き起こされる疾患」には、動脈硬化症、高脂血症、狭心症、心筋症、若年性突然死、外科的手術における事故が含まれる。

【0083】特発性心筋症は心筋症とも呼ばれ1980年、世界保健機構/世界心臓病学会連合の心筋症委員会において「原因未知の心筋疾患」と定義されたが1995年には「心機能不全を伴う心筋疾患」と再定義され、従来の肥大型、拡張型、拘束型の他に不整脈原性右室心筋症を加えた分類がなされた。CD36完全欠損例では今まで原因不明とされていた心筋症病態を呈する例が多く、本遺伝子が心筋症（肥大型あるいは拡張型）の原因遺伝子の一つと考えられる。心筋超音波断層を含む従来の検査法では、幼若年期の心筋症の診断は困難なことが多いが、本発明による判定法によれば出生前および出生直後の診断が可能である。また、両親の遺伝子を検索することにより、子供の遺伝子異常を推測することができる。特に、心移植しか治療の手段の無い拡張型心筋症の進展や予後の判定に、本発明の判定法は有効である。

【0084】幼若年者の突然死は、一見健康と思われる児童の運動中、運動直後に発生することが多い。本発明者等の検討によれば、これまでに調査を行ったCD36欠損症患者の家系には、乳児あるいは乳幼児期や小児期に突然死をした者が少なからず存在していることが判明した。

【0085】CD36欠損症患者が突然死に至る機序として、以下のように考えられる。心筋の主たるエネルギー源である長鎖脂肪酸代謝障害が存在する条件では、代替エネルギー源、例えばブドウ糖が使われる。従って、長鎖脂肪酸取り込み障害が存在する条件下で、ブドウ糖利用障害（例えば低血糖、空腹下での過激な運動、感染

症に起因する食不振、下痢、嘔吐、発熱あるいは糖代謝に必要なビタミンB1不足など）が加わると、重篤な事態を引き起こし、致死的なポンプ機能不全・不整脈を誘発しやすい状態になるものと推察される。出生後あるいは就学前にCD36遺伝子を解析し、CD36遺伝子異常の存在を前もって知り、適切な指導を行うことができる。また、原因不明の心疾患の家族歴（遺伝歴）を有する夫婦が子共を希望する際、両親の遺伝子の解析は、CD36遺伝子異常の推測が可能であり、夫婦間での将来設計に有用と考えられる。

【0086】外科技術の発達により、多くの心臓手術が行われているが、長鎖脂肪酸取り込み障害が存在するような症例においては、正常例と同様の心筋保護あるいは術後管理では不利なことが考えられる。事実、CD36欠損例で術後の予後が悪い症例が存在する。従って、CD36遺伝子の解析は、心臓手術のみならず大規模な手術を必要とする場合の術中、術後の事故発生の予防に有用と考えられる。

【0087】

【実施例】本発明者らは6970人の心臓に病歴のある人および疑いのある人について、長鎖脂肪酸の類似体である放射標識したiodine-labeled 15-(p-iodophenyl)-3-R,S-methylpentagecanoic acid (BMIPP)を用いた心筋シンチトグラムをとったところ、0.47%に相当する33名で心筋への脂肪酸の取り込みが完全に欠落していた（データ省略）。このうち、28名については染色体DNAを調製することが可能であった。これとは別に心筋への脂肪酸の取り込みが見られない心臓疾患を有する13名から染色体DNAを調製した。これを合わせて合計41検体について、フローサイトメトリー（flow cytometry）で血小板、および単球におけるCD36タンパクの発現を調べた結果、すべての例で血小板および単球ともCD36タンパクを発現していないことが解った（データ省略）。

【0088】本発明者らはこれら41検体につき染色体DNAを調製し、そのエクソン全領域に関して遺伝子変異の解析を行った。その結果、調べた41検体すべてにおいてエクソン4のC478T変異のhomozygote、或いは2種類の変異遺伝子をもつことが明らかになった（データ省略）。

【0089】また、この遺伝子に関して変異遺伝子を一方にしかもたないheterozygoteの人においても、部分的に長鎖脂肪酸の心筋への取り込みが見られない領域があり（Tanaka et al., J. Mol. Cell Cardiol., vol 29, pp 121-127, (1997)）、心臓へのエネルギー供給に何らかの異常が生じていると考えられる。

【0090】下記実施例においては上記41検体について試験を実施した。また、重症心不全に陥った27名の心筋症患者に対してパチスタ手術によって切除した組織

から染色体DNAを精製し、CD36遺伝子変異の検出を試みた。

【0091】実施例1：CD36遺伝子内の不特定変異検出

CD36遺伝子内の不特定変異を検出する方法を以下に詳述する。以下の実施例ではエクソン部分に存在する変異の検出の例について詳述するが、他の領域、即ちイントロン部分、遺伝子の上流のプロモーターを含む転写制御に関する領域、遺伝子下流のノンコーディング領域も同様な方法で解析することができる。また、以下にはPCR-PHFA法(1)による不特定変異検出法について記述するが、不特定変異遺伝子を検出することが可能な他のいかなる方法、即ちSSCP、DGGE、ミスマッチ切断法等による解析を行うことができる。また、PCRに使用したプライマー配列は、特異的に標的遺伝子領域を増幅できるものであれば、本実施例の配列に限定されるものではない。

【0092】(1) エクソン3の不特定変異の検出
以下にエクソン3における不特定変異の検出法について詳述する。

【0093】(i) 野生型非標識標準DNAの調製
CD36遺伝子に関して野生型の配列を有する染色体DNAを、末梢血リンパ球を原料としてQIAamp blood kit (QIAGEN社製)を使用して抽出した。

【0094】CD36-3U: 5'-OH-TTCTGTTTATGATCTCTTTCTAAT (配列番号13)

CD36-3L: 5'-OH-AATGAGAGGATATCTTTGACTAC (配列番号14)

上記の配列を有するCD36エクソン3増幅用非標識プライマー各10 pmolを用いて、抽出した染色体DNA100ngを鋳型として、200 μM dNTPs、2.5 mM MgCl₂、2.5 unit AmpliTaq Gold (Perkin Elmer - ABI社製)を加え、AmpliTaq Gold用緩衝液を用いて100 μlの反応液を作製した。PCR反応装置はGene Amp PCR system 9600 (Perkin Elmer - ABI)を用い、96℃、12分の前処理の後、熱変性94℃、30秒、アニーリング50℃、60秒および伸長反応72℃、60秒を1サイクルとし、40サイクル行った。増幅液50 μlを3% アガロースゲル電気泳動にかけ、269 bpの鎖長を有する目的物のバンドからDNAを抽出した。これをpT7 BlueT-Vect_{or}に導入し、大腸菌を形質転換した。得られた形質転換体からプラスミドを調製し、塩基配列を確認し、pEX03Wと命名した。

【0095】10 pgのプラスミドpEX04Wを鋳型として、上記のエクソン3増幅用非標識プライマー各10 pmolを用い、上記組成のPCR反応液を調製し、上記サイクル条件でPCR増幅し、エクソン3野生型非標識標準DNAを得た。

【0096】(ii) 標識試料DNAの調製

Bio-CD36-3U: 5'-biotin-TTCTGTTTATGATCTCTTTCTAAT (配列番号13)

DNP-CD36-3L: 5'-DNP-AATGAGAGGATATCTTTGACTAC (配列番号14)

患者の末梢血リンパ球からQIAamp blood kitを用いて抽出した染色体DNA30ngを鋳型として、上記のCD36エクソン4増幅用標識プライマー、各3 pmol、1 unit AmpliTaq Gold (Perkin Elmer - ABI社製)を含む200 μM dNTPs、2.5 mM MgCl₂を加え、30 μlのAmpliTaq Gold用緩衝液中で、上記PCR装置、PCRサイクル条件にて増幅を行い、標識試料DNAを得た。

【0097】(iii) 温度勾配によるアニーリング反応
1 μlの標識試料DNAと15 μlの非標識標準DNAを含む、終濃度3.3 x SSC (20 x SSC: 0.3 Mクエン酸ナトリウム、pH 7.0、0.3 M塩化ナトリウム) 溶液30 μlを調製し、Gene Amp PCR system 9600 (Perkin Elmer - ABI)を用いて熱変性後、温度勾配によるアニーリングを行った。温度勾配は、98℃、10分間加熱の後、98℃から70℃までを1℃/10分の速度で徐冷する条件で行った。

【0098】このとき、非標識標準DNAの代わりに15 μlのAmpliTaq Gold用緩衝液を加えて同様に調製したものを同様の熱変性、温度勾配によるアニーリングを行い、発色陽性コントロールとした。

【0099】(iv) 発色反応

(iii)で調製したアニーリング溶液20 μlをED-PCR (特許第2786857号)の系により発色操作を行った。各検体の発色陽性コントロールの示した吸光度と、非標識標準DNAを加えたものの吸光度との比を求め、標識DNAが再構成された割合を%で示したものをIndexとし、変異の有無を判定した。

【0100】(2) エクソン4の不特定変異の検出
エクソン4における不特定変異の検出は、使用したプライマー配列が以下のものであること、得られるPCR増幅物の鎖長が221 bpであること、および得られた野生型配列を持つプラスミドがpEX04Wであること以外はエクソン3と同様な操作を行って変異遺伝子を検出した。

【0101】CD36-4U: 5'-OH-CATAACCCAACTTATTTCTTTTCC (配列番号15)

CD36-4L: 5'-OH-AGTGTCTCATATTTGTGGGCACTCA (配列番号16)

Bio-CD36-4U: 5'-biotin-CATAACCCAACTTATTTCTTTTCC (配列番号15)

DNP-CD36-4L: 5'-DNP-AGTGTCTCATATTTGTGGGCACTCA (配列番号16)

エクソン4における不特定変異検出の結果を表1に示す。

【0102】(3) エクソン5の不特定変異の検出

エクソン5における不特定変異の検出は、使用したプライマー配列が以下のものであること、得られるPCR増幅物の鎖長が208bpであること、および得られた野生型配列を持つプラスミドがpEX05Wであること以外はエクソン3と同様な操作を行って変異遺伝子を検出した。

【0103】CD36-5U: 5'-OH-TTTGAATTTTGTACTGCTGTTTC (配列番号17)

CD36-5L: 5'-OH-AATAGATAACTTTGTGTTGTCTAC (配列番号18)

Bio-CD36-5U: 5'-biotin-TTTGAATTTTGTACTGCTGTTTC (配列番号17)

DNP-CD36-5L: 5'-DNP-AATAGATAACTTTGTGTTGTCTAC (配列番号18)

エクソン5における不特定変異検出の結果を表1に示す。

【0104】(4) エクソン6の不特定変異の検出
エクソン6における不特定変異の検出は、使用したプライマー配列が以下のものであること、得られるPCR増幅物の鎖長が240bpであること、および得られた野生型配列を持つプラスミドがpEX06Wであること以外はエクソン3と同様な操作を行って変異遺伝子を検出した。

【0105】CD36-6U: 5'-OH-TTGCTTAAACAGTGACTTTGTTT (配列番号19)

CD36-6L: 5'-OH-ATAATATTGCCATTCATATTGGTA (配列番号20)

Bio-CD36-6U: 5'-biotin-TTGCTTAAACAGTGACTTTGTTT (配列番号19)

DNP-CD36-6L: 5'-DNP-ATAATATTGCCATTCATATTGGTA (配列番号20)

【0106】(5) エクソン7の不特定変異の検出
エクソン7における不特定変異の検出は、使用したプライマー配列が以下のものであること、得られるPCR増幅物の鎖長が152bpであること、および得られた野生型配列を持つプラスミドがpEX07Wであること以外はエクソン3と同様な操作を行って変異遺伝子を検出した。

【0107】CD36-7U: 5'-OH-AAGTAACATTTCCCATACATATAT (配列番号21)

CD36-7L: 5'-OH-CATACATGCACATTTTACCAGAATA (配列番号22)

Bio-CD36-7U: 5'-biotin-AAGTAACATTTTCCCATACATATAT (配列番号21)

DNP-CD36-7L: 5'-DNP-CATACATGCACATTTTACCAGAATA (配列番号22)

【0108】(6) エクソン8の不特定変異の検出
エクソン8における不特定変異の検出は、使用したプライマー配列が以下のものであること、得られるPCR増幅物の鎖長が107bpであること、および得られた野

生型配列を持つプラスミドがpEX08Wであること以外はエクソン3と同様な操作を行って変異遺伝子を検出した。

【0109】CD36-8U: 5'-OH-TGTTTATTCATTGTCTTTTCTATT (配列番号23)

CD36-8L: 5'-OH-CTGTGATGACCACAAAACAAATATT (配列番号24)

Bio-CD36-8U: 5'-biotin-TGTTTATTCATTGTCTTTTCTATT (配列番号23)

DNP-CD36-8L: 5'-DNP-CTGTGATGACCACAAAACAAATATT (配列番号24)

【0110】(7) エクソン9の不特定変異の検出
エクソン9における不特定変異の検出は、使用したプライマー配列が以下のものであること、得られるPCR増幅物の鎖長が130bpであること、および得られた野生型配列を持つプラスミドがpEX09Wであること以外はエクソン3と同様な操作を行って変異遺伝子を検出した。

【0111】CD36-9U: 5'-OH-CTAATCATTTGCCACTCGATTTT (配列番号25)

CD36-9L: 5'-OH-AGCATACTTATACTTCAGTATCTGT (配列番号26)

Bio-CD36-9U: 5'-biotin-TAATCATTTGCCACTCGATTTT (配列番号25)

DNP-CD36-9L: 5'-DNP-AGCATACTTATACTTCAGTATCTGT (配列番号26)

【0112】(8) エクソン10の不特定変異の検出
エクソン10における不特定変異の検出は、使用したプライマー配列が以下のものであること、得られるPCR増幅物の鎖長が250bpであること、および得られた野生型配列を持つプラスミドがpEX10Wであること以外はエクソン3と同様な操作を行って変異遺伝子を検出した。

【0113】CD36-10U: 5'-OH-TGGAATGCAGCTCTTTTCTCTCTGT (配列番号27)

CD36-10L: 5'-OH-ATGGACTGTGCTACTGAGGTTATTT (配列番号28)

Bio-CD36-10U: 5'-biotin-TGGAATGCAGCTCTTTTCTCTCTGT (配列番号27)

DNP-CD36-10L: 5'-DNP-ATGGACTGTGCTACTGAGGTTATTT (配列番号28)

エクソン10における不特定変異検出の結果を表1に示す。

【0114】(9) エクソン11の不特定変異の検出
エクソン11における不特定変異の検出は、使用したプライマー配列が以下のものであること、得られるPCR増幅物の鎖長が179bpであること、および得られた野生型配列を持つプラスミドがpEX11Wであること以外はエクソン3と同様な操作を行って変異遺伝子を検出した。

【0115】CD36-11U: 5'-OH-TTCCAATTGACTCTTAAACTTGTC (配列番号29)

CD36-11L: 5'-OH-CCAAATCAGATCAATAAGGTGTTTT (配列番号30)

Bio-CD36-11U: 5'-biotin-TTCCAATTGACTCTTAAACTTGTC (配列番号29)

DNP-CD36-11L: 5'-DNP-CCAAATCAGATCAATAAGGTGTTTT (配列番号30)

【0116】(10) エキソン12の不特定変異の検出
エキソン12における不特定変異の検出は、使用したプライマー配列が以下のものであること、得られるPCR増幅物の鎖長が134bpであること、および得られた野生型配列を持つプラスミドがpEX12Wであること以外はエキソン3と同様な操作を行って変異遺伝子を検出した。

【0117】CD36-12U: 5'-OH-TTGGTAATTATTAGTTGTTCTCTT (配列番号31) または

CD36-12U2: 5'-OH-TTGGTAATTATTAGTTGTTCTCTTTTAG (配列番号32)

CD36-12L2: 5'-OH-TATCAAAATAACCATTTTCAAGAGACTCAC (配列番号33)

Bio-CD36-12U: 5'-biotin-TTGGTAATTATTAGTTGTTCTCTT (配列番号31) または

Bio-CD36-12U2: 5'-biotin-TTGGTAATTATTAGTTGTTCTCTTTTAG (配列番号32)

DNP-CD36-12L2: 5'-DNP-TATCAAAATAACCATTTTCAAGAGACTCAC (配列番号33)

【0118】(11) エキソン13の不特定変異の検出
エキソン13における不特定変異の検出は、使用したプライマー配列が以下のものであること、得られるPCR増幅物の鎖長が122bpであること、および得られた

野生型配列を持つプラスミドがpEX13Wであること以外はエキソン3と同様な操作を行って変異遺伝子を検出した。

【0119】CD36-13U3: 5'-OH-AGTTTATATGTTTCATAATTATTTCAACGT (配列番号34)

CD36-13L2: 5'-OH-TTTTAATGACTAACAGCTGCAAAATACAAAC (配列番号35)

Bio-CD36-13U3: 5'-biotin-AGTTTATATGTTTCATAATTATTTTCAACGT (配列番号34)

DNP-CD36-13L2: 5'-DNP-TTTTAATGACTAACAGCTGCAAAATACAAAC (配列番号35)

【0120】(12) エキソン14の不特定変異の検出
エキソン14における不特定変異の検出は、使用したプライマー配列が以下のものであること、得られるPCR増幅物の鎖長が225bpであること、および得られた野生型配列を持つプラスミドがpEX14Wであること以外はエキソン3と同様な操作を行って変異遺伝子を検出した。このPCR増幅物にはエキソン14に存在する終止コドンの下流約30塩基が含ま、それよりも下流の領域は含まない。

【0121】CD36-14U: 5'-OH-AAATAATGTTGATTATTAACCTTGAT (配列番号36)

CD36-14L: 5'-OH-TGAAGCAATATTTTGGTACATAC (配列番号37)

Bio-CD36-14U: 5'-biotin-AAATAATGTTGATTATTAACCTTGAT (配列番号36)

DNP-CD36-14L: 5'-DNP-TGAAGCAATATTTTGGTACATAC (配列番号37)

【0122】表1: エキソン4、#5、#10の不特定変異検出の結果

【表1】

表1: エキソン4、#5、#10の不特定変異検出の結果

| | exon #4 | | | | exon #5 | | | | exon #10 | | | |
|--------|---------|-------|-------|--------|---------|-------|-------|--------|----------|-------|-------|--------|
| | H20 | wild | index | 判定 | H20 | wild | index | 判定 | H20 | wild | index | 判定 |
| #301 | 1.205 | 0.317 | 26.3 | hetero | 1.291 | 0.120 | 9.3 | Wild | 1.367 | 0.108 | 7.9 | wild |
| #302 | 1.186 | 0.071 | 6.0 | wild | 1.192 | 0.098 | 8.7 | Wild | 1.335 | 0.092 | 6.9 | wild |
| #303 | 1.042 | 0.055 | 5.3 | wild | 1.112 | 0.071 | 6.4 | Wild | 1.188 | 0.072 | 6.1 | wild |
| #304 | 1.163 | 0.073 | 6.3 | wild | 1.190 | 0.102 | 8.6 | Wild | 1.252 | 0.080 | 6.4 | wild |
| #305 | 1.013 | 0.051 | 5.0 | wild | 1.082 | 0.074 | 6.8 | Wild | 1.208 | 0.067 | 5.6 | wild |
| #306 | 1.024 | 0.054 | 5.3 | wild | 1.092 | 0.080 | 7.3 | Wild | 1.210 | 0.064 | 5.3 | wild |
| #307 | 1.072 | 0.558 | 52.1 | homo | 1.152 | 0.100 | 8.7 | Wild | 1.267 | 0.081 | 6.4 | wild |
| #308 | 1.181 | 0.080 | 6.8 | wild | 1.220 | 0.103 | 8.5 | Wild | 1.270 | 0.075 | 5.9 | wild |
| #309 | 0.861 | 0.031 | 3.6 | wild | 0.971 | 0.045 | 4.6 | Wild | 1.111 | 0.051 | 4.6 | wild |
| #310 | 0.670 | 0.099 | 14.8 | hetero | 0.544 | 0.011 | 2.0 | Wild | 0.847 | 0.023 | 2.7 | wild |
| #311 | 0.949 | 0.045 | 4.8 | wild | 1.083 | 0.096 | 8.9 | Wild | 1.214 | 0.062 | 5.1 | wild |
| #312 | 0.897 | 0.060 | 6.7 | wild | 0.803 | 0.036 | 4.5 | Wild | 1.066 | 0.052 | 4.9 | wild |
| #313 | 1.105 | 0.257 | 28.3 | hetero | 1.168 | 0.108 | 9.3 | Wild | 1.211 | 0.083 | 6.9 | wild |
| #314 | 0.976 | 0.202 | 20.7 | hetero | 1.087 | 0.343 | 31.6 | Hetero | 1.147 | 0.064 | 5.6 | wild |
| #315 | 1.183 | 0.298 | 25.2 | hetero | 1.252 | 0.131 | 10.5 | Wild | 1.306 | 0.215 | 18.5 | hetero |
| #316 | 1.135 | 0.223 | 19.8 | hetero | 1.236 | 0.113 | 9.2 | Wild | 1.287 | 0.189 | 14.7 | hetero |
| #317 | 0.898 | 0.499 | 55.6 | homo | 1.298 | 0.097 | 7.5 | Wild | 1.106 | 0.059 | 5.3 | wild |
| #318 | 1.117 | 0.670 | 60.0 | homo | 1.492 | 0.143 | 9.6 | Wild | 1.262 | 0.092 | 7.3 | wild |
| #319 | 0.821 | 0.397 | 48.4 | homo | 1.047 | 0.054 | 5.2 | Wild | 0.966 | 0.045 | 4.7 | wild |
| #320 | 0.904 | 0.470 | 52.0 | homo | 0.768 | 0.018 | 2.4 | Wild | 1.031 | 0.082 | 8.0 | wild |
| #321 | 0.934 | 0.471 | 50.4 | homo | 1.472 | 0.133 | 9.0 | Wild | 1.141 | 0.072 | 5.3 | wild |
| #322 | 0.946 | 0.517 | 54.7 | homo | 1.435 | 0.141 | 9.8 | Wild | 1.125 | 0.077 | 6.9 | wild |
| #323 | 0.965 | 0.048 | 5.0 | wild | 1.302 | 0.100 | 7.7 | Wild | 0.898 | 0.032 | 3.6 | wild |
| #324 | 1.018 | 0.057 | 5.6 | wild | 1.337 | 0.097 | 7.3 | Wild | 1.113 | 0.064 | 5.8 | wild |
| #325 | 1.001 | 0.538 | 53.8 | homo | 1.310 | 0.139 | 10.6 | Wild | 1.189 | 0.078 | 6.6 | wild |
| #326 | 1.040 | 0.052 | 5.0 | wild | 1.216 | 0.114 | 9.4 | Wild | 1.174 | 0.078 | 6.7 | wild |
| #327 | 1.050 | 0.053 | 5.1 | wild | 1.270 | 0.137 | 10.8 | Wild | 1.083 | 0.074 | 6.8 | wild |
| #328 | 1.113 | 0.067 | 6.0 | wild | 1.318 | 0.158 | 12.0 | Wild | 1.020 | 0.051 | 5.0 | wild |
| #329 | 1.021 | 0.052 | 5.1 | wild | 1.173 | 0.104 | 8.9 | Wild | 1.047 | 0.065 | 6.2 | wild |
| #330 | 1.127 | 0.060 | 5.3 | wild | 1.305 | 0.146 | 11.2 | Wild | 1.173 | 0.090 | 7.7 | wild |
| Wild | 1.135 | 0.075 | 6.6 | wild | 1.353 | 0.180 | 13.3 | Wild | 1.190 | 0.095 | 8.0 | wild |
| Hetero | 1.081 | 0.306 | 28.3 | hetero | 1.257 | 0.425 | 33.8 | Hetero | 1.281 | 0.246 | 19.2 | hetero |

【0123】Wild: 野生型、Hetero: 変異が片側のアレ
ルに存在する、Homo: 変異が両側のアレルに存在する。

【0124】判定は以下のカットオフ値にしたがった。

【0125】エキソン4 Wild: Index < 10, hetero
zygote: $10 \leq \text{Index} < 30$, homozygote (mutant): $30 \leq \text{Index}$

エキソン5 Wild: Index < 15, heterozygote: $15 \leq \text{Index} < 40$, homozygote (mutant): $40 \leq \text{Index}$

エキソン10 Wild: Index < 10, heterozygote: $10 \leq \text{Index} < 30$, homozygote (mutant): $30 \leq \text{Index}$

【0126】実施例2: CD36遺伝子内の特定変異検
出

CD36遺伝子内の特定変異を検出する方法を以下に詳
述する。以下の実施例ではエキソン部分に存在する変異
の検出の例について詳述するが、他の領域、即ちイント
ロン部分、遺伝子の上流のプロモーターを含む転写制御
に関する領域、遺伝子下流のノンコーディング領域も同
様な方法で解析することができる。また、以下にはPC
R-PHFA法(II)による特定変異検出法について
記述するが、特定変異遺伝子を検出することが可能な他
のいかなる方法、即ちASO法、SSP法、direct
sequencing等による解析を行うことがで
きる。また、PCRに使用したプライマー配列は、特異
的に標的遺伝子領域を増幅できるものであれば、本実施
例の配列に限定されるものではない。

【0127】本実験を開始する時点で本遺伝子には以下
にあげる3種類の変異遺伝子が報告されていた。

【0128】C478T変異: エキソン4の478番目
のシトシンがチミンに置換したもの。

【0129】539AC欠失: エキソン5の539、5
40番目のアデニンとチミンが欠失したもの。

【0130】1159A挿入: エキソン10の1159
番目にアデニンが挿入されたもの。

【0131】上記変異遺伝子はPCR-RFLP法によ
って同定することが可能で、本実験に用いた染色体DN
Aはこの方法で同定したものである。

【0132】以下に本題で行った特定変異の検出法につ
いて述べる。

【0133】(1) エキソン4の特定変異検出

(i) 標識標準DNAの調製

エキソン4においては今までにC478Tの変異が同定
されている。この変異遺伝子は野生遺伝子に存在する制
限酵素Sau96Iの切断部位が消失することが知られ
ており、これによってこの変異遺伝子と同定することが
できる。このようにして同定したC478T変異遺伝子
を有する染色体DNAを、CD36エキソン4増幅用非
標識プライマーを用いてPCR増幅し、その増幅物をp
T7Blue-T Vectorに導入し、大腸菌を形
質転換した。得られた形質転換体からプラスミドを調製
し、塩基配列を確認しpEX04Mを得た。

【0134】エクソン4の不定検出の項で作製したpEX04W、および上記操作で作製したpEX04M各10pgを鋳型としてCD36エクソン4増幅用標識プライマー各10nmolを用いて100μlの反応系でPCR増幅を行うことによって野生型、C478T変異型の標識標準DNAを調製した。なお、反応条件等は既述の通りである。

【0135】(ii) 非標識試料DNAの調製
患者の末梢リンパ球から既述のキットを用いて染色体DNAを調製した。染色体DNA50ngを鋳型として、CD36エクソン4増幅用非標識プライマー各5pmol、AmpliTaQ God 1.5 unitを用いて液量50μlでPCR増幅を行った。

【0136】(iii) 温度勾配によるアニーリング
1μlの標識標準DNAと15μlの非標識試料DNAを含む、終濃度3.3xSSC溶液30μlを調製し、Gene Amp PCR system 96を用いて熱変性後、温度勾配によるアニーリングを行った。温度勾配は、98℃、10分間加熱の後、98℃から70℃までを1℃/10分の速度で徐冷する条件で行った。

【0137】このとき、非標識試料DNAの代わりに15μlのAmpli TaQ Gold用緩衝液を加えて同様に調製したものを同様の熱変性、温度勾配によるアニーリングを行い、発色陽性コントロールとした。

【0138】(iv) 発色反応

(iii) で調製したアニーリング溶液20μlをED-PCRの系により発色操作を行った。各検体の発色陽性コントロールの示した吸光度と、非標識試料DNAを加えたものの吸光度との比を求め、標識DNAが再構成された割合を%で示したものをIndexとし、変異の有無を判定した。

【0139】(2) エクソン5の特定変異検出

(i) 標識標準DNAの調製

エクソン5においては今までに539AC欠失の変異が同定されている。この変異遺伝子を有する染色体DNAを、CD36エクソン5増幅用非標識プライマーを用い

てPCR増幅し、その増幅物をpT7Blue - T Vectorに導入し、大腸菌を形質転換した。得られた形質転換体からプラスミドを調製し、塩基配列を確認しpEX05Mを得た。

【0140】(ii) 非標識試料DNAの調製
患者の末梢リンパ球から既述のキットを用いて染色体DNAを調製した。染色体DNA50ngを鋳型として、CD36エクソン5増幅用非標識プライマー各5pmol、AmpliTaQ God 1.5 unitを用いて液量50μlでPCR増幅を行った。

【0141】(iii) 温度勾配によるアニーリング
エクソン4の特定変異検出と同様の操作を行った。

【0142】(iv) 発色反応
エクソン4の特定変異検出と同様の操作を行った。

【0143】(3) エクソン10の特定変異検出

(i) 標識標準DNAの調製

エクソン10においては今までに1159A挿入変異が同定されている。この変異遺伝子を有する染色体DNAを、CD36エクソン10増幅用非標識プライマーを用いてPCR増幅し、その増幅物をpT7Blue - T Vectorに導入し、大腸菌を形質転換した。得られた形質転換体からプラスミドを調製し、塩基配列を確認しpEX10Mを得た。

【0144】(ii) 非標識試料DNAの調製

患者の末梢リンパ球から既述のキットを用いて染色体DNAを調製した。染色体DNA 50ngを鋳型として、CD36エクソン10増幅用非標識プライマー各5pmol、AmpliTaQ God 1.5 unitを用いて液量50μlでPCR増幅を行った。

【0145】(iii) 温度勾配によるアニーリング
エクソン4の特定変異検出と同様の操作を行った。

【0146】(iv) 発色反応

エクソン4の特定変異検出と同様の操作を行った。

【0147】

【表2】

表2：エクソン4、#5、#10の特定変異検出の結果

| | Exon #4 | | | Exon #5 | | | Exon #10 | | |
|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|----------|--------|--------|
| | Index | | 判定 | Index | | 判定 | Index | | 判定 |
| | wild | mutant | | wild | mutant | | wild | mutant | |
| 試料 | 100.0 | 100.0 | | 100.0 | 100.0 | | 100.0 | 100.0 | |
| wild | 2.8 | 50.2 | wild | 5.1 | 59.5 | wild | 3.9 | 27.5 | wild |
| Hetero | 4.8 | 5.6 | hetero | 9.0 | 10.3 | hetero | 7.8 | 6.3 | hetero |
| mutant | 49.8 | 2.8 | mutant | 64.1 | 5.0 | mutant | 27.1 | 4.2 | mutant |
| #01 | 4.7 | 53.5 | wild | 10.2 | 68.1 | wild | 6.7 | 32.5 | wild |
| #101 | 6.0 | 8.9 | hetero | 9.3 | 61.4 | wild | 9.8 | 9.5 | hetero |
| #08 | 3.8 | 49.4 | wild | 17.1 | 16.1 | hetero | 6.3 | 35.0 | wild |
| #501 | 3.7 | 51.0 | wild | 8.5 | 64.0 | wild | 5.9 | 31.3 | wild |
| #502 | 5.9 | 8.1 | hetero | 8.2 | 61.1 | wild | 5.7 | 30.1 | wild |
| #503 | 3.8 | 49.5 | wild | 13.7 | 64.4 | wild | 5.3 | 32.3 | wild |
| #504 | 6.7 | 6.7 | hetero | 8.4 | 63.9 | wild | 5.3 | 31.8 | wild |
| #505 | 7.5 | 7.8 | hetero | 15.3 | 18.5 | Hetero | 6.6 | 33.4 | wild |
| #506 | 3.9 | 51.4 | wild | 7.3 | 62.1 | wild | 5.4 | 33.4 | wild |
| #507 | 7.1 | 7.4 | hetero | 9.9 | 65.7 | wild | 5.7 | 32.5 | wild |

【0148】Wild：野生型、Hetero：変異が片側のアレルに存在する、Homo：変異が両側のアレルに存在する。

【0149】変異遺伝子は以下のものを用いた
エクソン4：C478T置換、エクソン5：539A挿入、エクソン10：1159AC欠失
いずれのエクソンともIndexが20以下のものを陽性と判定した。

【0150】実施例3：CD36遺伝子内の新規変異遺伝子の同定

すでに述べた方法によって患者のCD36遺伝子の解析を行い、不特定変異の検出の項で変異が存在すると判定されたもののうち、特定変異の検出の項で変異が検出されなかったものについては今までに報告されていない変異遺伝子を持つことが示唆される。

【0151】(1) 変異遺伝子Ex13 del 12の同定

検体#03はCD36遺伝子の特定、不特定変異の検出によって、エクソン4のC478T変異のほかエクソン13に何らかの変異を持つことが示唆された。この検体のエクソン13に存在する新たな変異遺伝子の同定法について詳細する。

【0152】検体#03の染色体DNA100ngを鋳型としてCD36エクソン13増幅用非標識プライマー（配列は既述）各100pmol、2.5unitのAmpliQ Goldを用い、既述の組成を持つPCR反応液を調製した。これを既述の条件でPCR増幅を行い、増幅物を得た。3%アガロースゲル電気泳動を行い、目的のフラグメントを抽出し、pT7BlueT-Vectoerに導入後、大腸菌を形質転換した。得られた形質転換体からプラスミドDNAを抽出し、ABI-PRISM377を用いて塩基配列の決定を行った。その結果、この検体はエクソン13の内部に12塩基の欠失があることが明らかになった。この変異によって生成するタンパ

クはIle-Val-Pro-Ileの4アミノ酸が欠失したものとなる。

【0153】なお、検体#107、#201、#326も同じ変異遺伝子を持つことが解った。

【0154】(2) 変異遺伝子Ex13 dup 43の同定

検体#07はCD36遺伝子の特定、不特定変異の検出によって、エクソン5の539AC欠失以外にエクソン13に変異を持つことが示唆された。この検体をCD36エクソン13増幅用非標識プライマー（配列は既述）によってPCR増幅後、上述の方法により塩基配列を確認した。その結果、この検体はエクソン13内に43bpの配列が重複していることが明らかになった。この結果、途中で終止コドンが出現し、生成するタンパクは未成熟な状態で翻訳が停止する。

【0155】(3) 変異遺伝子Ex13 skipの同定

検体#206はCD36遺伝子の特定、不特定変異の検出によって、エクソン10の1159A挿入以外にエクソン13に変異を持つことが示唆された。この検体をCD36エクソン13増幅用非標識プライマー（配列は既述）によってPCR増幅後、上述の方法により塩基配列を確認した。その結果、この検体はエクソン13の直前のイントロン部分からエクソン部分にかけて10塩基の欠失が見られた。これによってイントロンの3'-splice acceptor部位の配列が変化し、スプライシング異常が生じることが予想される。

【0156】cDNAの配列決定の結果、この検体はエクソン12からエクソン14につながっており、エクソン13が完全に欠落(skip)していることが確認された。

【0157】なお、この解析によって、J. Biol. Chem. (1994), vol 22, pp 18985-18991に示されているCD36

の野生型遺伝子のエキソン13上流のイントロン配列が5'-gttcataattatttttcaacgtattacg-エキソン13ではなく5'-gttcataattatttttcaacgtatattacg-エキソン13であることが明らかになった。

【0158】(4) 変異遺伝子T970Cの同定

検体#104はCD36遺伝子の特定、不特定変異の検出によって、エキソン4のC478T変異のほかエキソン9に変異をもつことが示唆された。この検体をCD36エキソン9増幅用非標識プライマー（配列は既述）によってPCR増幅後、上述の方法により塩基配列を確認した。その結果、エキソン9の970番目のチミンがシトシンに置換していることが確認された。これにより、この遺伝子から発現されるタンパクはPheからValに置換したものとなる。

【0159】(5) 変異遺伝子770A挿入の同定

検体#805はCD36遺伝子の特定、不特定変異の検出によって、エキソン4のC478T変異のほかエキソン6に変異をもつことが示唆された。この検体をCD36エキソン6増幅用非標識プライマー（配列は既述）によってPCR増幅後、上述の方法により塩基配列を確認した。その結果、エキソン6の770番目にチミンが1塩基挿入していることが確認された。これにより、リーディングフレームがずれ、終止コドンが出現し、この遺伝子から発現されるタンパクは未成熟なタンパクとなる。

【0160】(6) 変異遺伝子T620Cの同定

検体#413はCD36遺伝子の特定、不特定変異の検出によって、エキソン5に既に報告されている変異、539AC欠失以外の変異遺伝子をもつことが示唆された。この検体をCD36エキソン5増幅用非標識プライマー（配列は既述）によってPCR増幅後、上述の方法により塩基配列を確認した。その結果、エキソン5の620番目のチミンがシトシンに置換していることが確認された。これにより、この遺伝子から発現されるタンパクはValからAlaに置換したものとなる。

【0161】以下に検体#413を解析した結果を示す。表3には不特定変異の検出の結果を、表4にはエキソン5で知られていた539ACdelの特定変異の検出の結果を示す。

【0162】

【表3】

表3

検体#413を含む多検体についてエキソン5について不特定変異を検出した結果

| 検体 | A405 (nm) | | Index | 判定 |
|------|-----------|-------|-------|--------|
| | 試料 | Wild | | |
| #401 | 1.770 | 0.075 | 4.2 | wild |
| #402 | 1.593 | 0.054 | 3.4 | wild |
| #403 | 1.937 | 0.088 | 4.5 | wild |
| #404 | 1.577 | 0.054 | 3.4 | wild |
| #405 | 2.072 | 0.091 | 4.4 | wild |
| #406 | 2.072 | 0.101 | 4.9 | wild |
| #407 | 1.805 | 0.083 | 4.6 | wild |
| #408 | 1.936 | 0.079 | 4.1 | wild |
| #409 | 2.420 | 0.183 | 7.6 | wild |
| #410 | 2.289 | 0.150 | 6.6 | wild |
| #411 | 2.348 | 0.130 | 5.5 | wild |
| #412 | 2.359 | 0.150 | 6.4 | wild |
| #413 | 2.039 | 0.475 | 23.3 | hetero |

【0163】

【表4】

表 4

検体#413 のエキソン 5 における特定変異の検出

| | 野生型 | | 539ACdel | |
|------|-------|-------|----------|-------|
| | A405 | Index | A405 | Index |
| #404 | 0.180 | 10.8 | 1.520 | 91.8 |
| #406 | 0.163 | 9.8 | 1.487 | 89.9 |
| #407 | 0.120 | 7.2 | 1.533 | 92.6 |
| #413 | 0.276 | 16.6 | 1.616 | 97.6 |
| 試料 | 1.665 | | 1.655 | |

【0164】カットオフ値20以下のものを陽性と判定した。その結果、#413の検体は表3の結果からエキソン5に何らかの変異を有するが、既に報告されている539ACdelの変異遺伝子は有しないと言う結論になる。このことからこの検体が新規変異遺伝子を有することが強く示唆された。

【0165】(7) 変異遺伝子T716Gの同定
検体#872はCD36遺伝子の特定、不特定変異の検出によって、エキソン6に、本発明によって明らかとなった770A挿入(770insA)以外の変異を持つことが示唆された。この検体をエキソン6増幅用プライマー(配列は既述)によってPCR増幅後、上述の方法により塩基配列を確認した。その結果、エキソン6の716番目のチミンがグアニンに置換していることが確認された。これにより、この遺伝子からは169番目のアミノ酸が本体のメチオニン(ATG)からアルギニン(ACG)に

SEQUENCE LISTING

```

<110>; WAKUNAGA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
<120>; CD36 MUTANT GENE AND METHODS FOR DETERMINING DISEASES CAUSED BY AB
NORMAL LIPID METABOLISM AND DIAGNOSTIC KITS THEREFOR
<130>; 123052US
<150>; JP3446/1999
<151>; 1999-01-08
<150>; JP264052/1999
<151>; 1999-09-17
<160>; 44
<170>; PatentIn Ver. 2.0
<210>; 1
<211>; 112
<212>; DNA
<213>; Homo sapiens
<400>; 1
agtttatatg ttcataatta ttttcaacgt atattacaga gtattaaaga atctgaagag 60
gaactatctt tggcttaagt aggtttgtat ttgcagctgt tagtcattaa aa      112
<210>; 2
<211>; 167

```

変異したタンパク質を生成する。

【0166】(8) 変異遺伝子Ex12 Skipの同定
検体#811はCD36変異遺伝子の特定、不特定変異の検出によって、エキソン4のC478T変異以外にエキソン12に変異を有することが示唆された。この検体をエキソン12増幅用プライマー(配列は既述)によって、PCR増幅後、上述の方法により塩基配列を確認した。その結果、エキソン12の上流に存在するイントロン部分に7塩基の欠失が存在することが明らかとなった。これによってイントロンの3'-splice acceptor部位の配列が変化し、スプライシング異常が生じることが予想される。cDNAの配列決定の結果、この検体はエキソン11からエキソン13につながっており、エキソン12が完全に欠落(skip)していることが確認された。

【0167】

【配列表】

<;212>; DNA
 <;213>; Homo sapiens
 <;400>; 2
 agtttatatg ttcataatta tttcaacgt atattacaga gtattaaaga atctgaagag 60
 gaactatatt gtgcctattc ttggccttaa agaactctgaa gaggaactat attgtgccta 120
 ttctttggct taatgagggt tgtatttgca gctgttagtc attaaaa 167
 <;210>; 3
 <;211>; 114
 <;212>; DNA
 <;213>; Homo sapiens
 <;400>; 3
 agtttatatg ttcataatta tttcaacgt atattaaaga atctgaagag gaactatatt 60
 gtgcctattc ttggccttaa tgagggttgt atttcagct gttagtcatt aaaa 114
 <;210>; 4
 <;211>; 127
 <;212>; DNA
 <;213>; Homo sapiens
 <;400>; 4
 ttggttaatta tttagttgtt ctcttaactg gattcacitt acaatttgca aaacggctgc 60
 aggccaacct attggtcaag ccatacagaaa aaattcagtg agtctcttga aaatggttat 120
 tttgata 127
 <;210>; 5
 <;211>; 130
 <;212>; DNA
 <;213>; Homo sapiens
 <;400>; 5
 ctaatcattt gccactcgat ttttaaacag atgcagcctc acttccacct ttgttgaga 60
 aaagccagggt attgcagttc ttttctctg atatttcag gtaagacaga tactgaagta 120
 taagtatgct 130
 <;210>; 6
 <;211>; 241
 <;212>; DNA
 <;213>; Homo sapiens
 <;400>; 6
 ttgtcttaaa cagtgacttt gttttgtag gctgcatccc atatctatca aaatcaattt 60
 gttcaaatga tcctcaattc acttattaac aagtcaaaat cttctatgtt ccaagtcaga 120
 actttgagag aactgttatg gggctatagg gatccatttt ttgagtttgg tccgtaccc 180
 tgttactacc acagttggtc tgttttatcc tgtaagtacc aaatatgaat ggcaatatta 240
 t 241
 <;210>; 7
 <;211>; 240
 <;212>; DNA
 <;213>; Homo sapiens
 <;400>; 7
 ttgtcttaaa cagtgacttt gttttgtag gctgcatccc atatctatca aaatcaattt 60
 gttcaaatga tcctcaattc acttattaac aagtcaaaat cttctaggtt ccaagtcaga 120
 actttgagag aactgttatg gggctatagg gatccatttt tgagtttgg tccgtaccct 180
 gttactacca cagttggtct gttttatcct gtaagtacca aatatgaat gcaatattat 240
 <;210>; 8
 <;211>; 207

```

<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 8
tttgaatttt gtttactgct gtttctttag agttcgtttt ctagccaagg aaaatgtaac 60
ccaggacgct gaggacaaca cagtctcttt cctgcagccc aatgggtcca tcttcgaacc 120
ttcactatca gttggaacag aggctgcaac ttcacagctc tcaatctggc tgtggcagtg 180
agtagacaaa caacaaagt atctatt                                     207
<;210>; 9
<;211>; 1870
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 9
gaaaaatcct tcttagccat tttaaagata gctttccaat gattagacga attgattctt 60
tctgtgactc atcagttcct ttcctgtaaa attcatgtct tgctgttgat ttgtgaataa 120
gaaccagagc ttgtagaaac cactttaatc atatccagga gtttgcaaga aacagggtgct 180
taacactaat tcacctcctg aacaagaaaa atgggctgtg accggaactg tgggctcctc 240
gctggggctg tcattgggtg tgccttggtg gtgtttggag gtattctaatt gccagttgga 300
gacctgttta tccagaagac aattaaaaag caagttgtcc tcgaagaagg tacaattgct 360
tttaaaaatt ggggttaaac aggcacagaa gtttacagac agttttggat ctttgatgtg 420
caaaatccac aggaagtgat gatgaacagc agcaacattc aagttaagca aagaggtcct 480
tatacgtaca gagttcgttt tctagccaag gaaaatgtaa cccaggacgc tgaggacaac 540
acagtctctt tcctgcagcc caatgggtgcc atcttcgaac cttcactatc agttggaaca 600
gaggctgaca acttcacagt tctcaatctg gctgtggcag ctgcatccca tatctatcaa 660
aatcaatttg ttcaaatgat cctcaattca cttattaaca agtcaaaatc ttctatgttc 720
caagtcagaa ctttgagaga actgttatgg ggctataggg atccattttt gagtttggtt 780
ccgtaccctg ttactaccac agttgggtctg ttttaccctt acaacaatac tgcagatgga 840
gtttataaag ttttcaatgg aaaagataac ataagtaaag ttgccataat cgacacatat 900
aaaggtaaaa ggaatctgtc ctattgggaa agtcactgcg acatgattaa tggtagacat 960
gcagcctcat ttccaccttt tgttgagaaa agccagggtat tgcagttctt ttctctgat 1020
atttgcaggt caatctatgc tgtatttgaa tccgacgtta atctgaaagg aatccctgtg 1080
tatagatttg ttcttccatc caaggccttt gcctctccag ttgaaaaccc agacaactat 1140
tgtttctgca cagaaaaaat tatctcaaaa aattgtacat catatgggtg gctagacatc 1200
agcaaatgca aagaaggagg acctgtgtac atttcacttc ctcattttct gtatgcaagt 1260
cctgatgttt cagaacctat tgatggatta aacccaaatg aagaagaaca taggacatac 1320
ttggatattg aacctataac tggattcact ttacaatttg caaacggct gcaggtcaac 1380
ctattgtgca agccatcaga aaaaattcaa gtattaaaga atctgaagag gaactatatt 1440
gtgcctatc tttggcttaa tgagactggg accattgggtg atgagaaggc aaacatgttc 1500
agaagtcaag taactggaaa aataaacctc cttggcctga tagaaatgat cttactcagt 1560
gttggtgtgg tgatgtttgt tgcttttatg atttcattat gtgcattgag atcgaaaaca 1620
ataaaataag tatgtacaa aaaatattgc ttcaataata ttagcttata tattacttgt 1680
tttcacttta tcaaagagaa gttacatatt aggccatata ttttctaga catgtctagc 1740
cactgatcat ttttaatat aggtaaataa acctataaat attatcacgc agatcactaa 1800
agtatatctt taattctggg agaaatgaga taaaagatgt acttgtgacc attgtaacaa 1860
tagcacaat                                     1870
<;210>; 10
<;211>; 221
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 10
cataacccaa acttattttc ttttccatag caagttgtcc tcgaagaagg tacaattgct 60

```

```

tttaaaaatt gggttaaaac aggcacagaa gtttacagac agttttggat ctttgatgtg 120
caaaatccac aggaagtgat gatgaacagc agcaacattc aagttaagca aagaggttct 180
tatacgtaca ggtgagttag tgcccacaaa tatgagacac t 221
<;210>; 11
<;211>; 206
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 11
tttgaatttt gtttactgct gtttcttttag agttcgtttt ctagccaagg aaaatgtaac 60
ccaggacgct gaggacaaca gtctctttcc tgcagcccaa tgggtccatc ttcgaacctt 120
cactatcagt tggaacagag gctgacaact tcacagtctc caatctggct gtggcagtga 180
gtagacaaac aacaaagtta tctatt 206
<;210>; 12
<;211>; 251
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 12
tggaatgcag ctcttttttc tctgtattta ggtcaatcta tgctgtattt gaatccgacg 60
ttaatctgaa aggaatccct gtgtatagat ttgttcttcc atccaaggcc ttgcctctc 120
cagttgaaaa ccagacaac tattgtttct gcacagaaaa aattatctca aaaaaattgt 180
acatcatatg gtgtgctaga catcagcaaa tgcaaagaag gtgagtaaat aacctcagta 240
gcacagtcca t 251
<;210>; 13
<;211>; 25
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 13
ttctgtttta tgatctcttt ctaat 25
<;210>; 14
<;211>; 24
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 14
aatgagagga tattctttga ctac 24
<;210>; 15
<;211>; 26
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 15
cataacccaa acttattttc ttttcc 26
<;210>; 16
<;211>; 25
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 16
agtgtctcat atttggggc actca 25

<;210>; 17
<;211>; 25
<;212>; DNA

```

| | |
|------------------------------|----|
| <;213>; Homo sapiens | |
| <;400>; 17 | |
| tttgaatttt gtttactgct gtttc | 25 |
| <;210>; 18 | |
| <;211>; 26 | |
| <;212>; DNA | |
| <;213>; Homo sapiens | |
| <;400>; 18 | |
| aatagataac ttgtttgttt gtctac | 26 |
| <;210>; 19 | |
| <;211>; 25 | |
| <;212>; DNA | |
| <;213>; Homo sapiens | |
| <;400>; 19 | |
| ttgtcttaaa cagtgacttt gtttt | 25 |
| <;210>; 20 | |
| <;211>; 25 | |
| <;212>; DNA | |
| <;213>; Homo sapiens | |
| <;400>; 20 | |
| ataatattgc cattcatatt tggta | 25 |
| <;210>; 21 | |
| <;211>; 25 | |
| <;212>; DNA | |
| <;213>; Homo sapiens | |
| <;400>; 21 | |
| aagtaacatt ttcccatata tatat | 25 |
| <;210>; 22 | |
| <;211>; 25 | |
| <;212>; DNA | |
| <;213>; Homo sapiens | |
| <;400>; 22 | |
| catacatgca cattttacca gaata | 25 |
| <;210>; 23 | |
| <;211>; 25 | |
| <;212>; DNA | |
| <;213>; Homo sapiens | |
| <;400>; 23 | |
| tgttttattca ttgtcttttt ctatt | 25 |
| <;210>; 24 | |
| <;211>; 25 | |
| <;212>; DNA | |
| <;213>; Homo sapiens | |
| <;400>; 24 | |
| ctgtgatgac cacaaaacaa atatt | 25 |
| <;210>; 25 | |
| <;211>; 25 | |
| <;212>; DNA | |
| <;213>; Homo sapiens | |

| | |
|----------------------------------|----|
| <;400>; 25 | |
| ctaatacattt gccactcgat tttta | 25 |
| <;210>; 26 | |
| <;211>; 25 | |
| <;212>; DNA | |
| <;213>; Homo sapiens | |
| <;400>; 26 | |
| agcataactta tacttcagta tctgt | 25 |
| <;210>; 27 | |
| <;211>; 25 | |
| <;212>; DNA | |
| <;213>; Homo sapiens | |
| <;400>; 27 | |
| tggaatgcag ctcttttttc tctgt | 25 |
| <;210>; 28 | |
| <;211>; 25 | |
| <;212>; DNA | |
| <;213>; Homo sapiens | |
| <;400>; 28 | |
| atggactgtg ctactgaggt tattt | 25 |
| <;210>; 29 | |
| <;211>; 25 | |
| <;212>; DNA | |
| <;213>; Homo sapiens | |
| <;400>; 29 | |
| ttccaattga ctcttaaac ttgtc | 25 |
| <;210>; 30 | |
| <;211>; 25 | |
| <;212>; DNA | |
| <;213>; Homo sapiens | |
| <;400>; 30 | |
| ccaaatcaga tcaataaggt gtttt | 25 |
| <;210>; 31 | |
| <;211>; 25 | |
| <;212>; DNA | |
| <;213>; Homo sapiens | |
| <;400>; 31 | |
| ttggttaatta tttagttggt ctctt | 25 |
| <;210>; 32 | |
| <;211>; 30 | |
| <;212>; DNA | |
| <;213>; Homo sapiens | |
| <;400>; 32 | |
| ttggttaatta tttagttggt ctcttttag | 30 |
| <;210>; 33 | |
| <;211>; 30 | |
| <;212>; DNA | |
| <;213>; Homo sapiens | |
| <;400>; 33 | |
| tatcaaaata accatittca agagactcac | 30 |

```

<;210>; 34
<;211>; 30
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 34
agttttatatg ttcataatta ttttcaacgt 30
<;210>; 35
<;211>; 30
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 35
ttttaatgac taacagctgc aaatacaaac 30
<;210>; 36
<;211>; 25
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 36
aaataatggt gattattaac ttgat 25
<;210>; 37
<;211>; 25
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 37
tgaagcaata ttttttggtata catac 25
<;210>; 38
<;211>; 124
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 38
agttttatatg ttcataatta ttttcaacgt atattacaga gtattaaaga atctgaagag 60
gaactatatt gtgcctattc ttggccttaa tgaggtttgt atttgcagct gttagtcatt 120
aaaa 124
<;210>; 39
<;211>; 134
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 39
ttggttaatta tttagttggt ctccttttag ataactggat tcactttaca atttgcaaaa 60
cggtctgcagg tcaacctatt ggtcaagcca tcagaaaaaa ttcagttagt ctccttgaaaa 120
tggttatttt gata 134
<;210>; 40
<;211>; 250
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 40
tggaatgcag ctcctttttc tctgtattta ggtcaatcta tgctgtattt gaatccgacg 60
ttaatctgaa aggaatccct gtgtatagat ttgtctctcc atccaaggcc ttgacctctc 120
cagttgaaaa cccagacaac tattgtttct gcacagaaaa aattatctca aaaaattgta 180
catcatatgg tgtgctagac atcagcaaat gcaagaaggg tgagtaaata acctcagtag 240
cacgtccat 250

```



```

<;210>; 41
<;211>; 130
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 41
ctaatacattt gccactcgat ttttaaacag atgcagcctc atttccacct ttgttgaga 60
aaagccaggt attgcagttc ttttctctcg atatttgag gtaagacaga tactgaagta 120
taagtatgct 130
<;210>; 42
<;211>; 240
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 42
ttgtctttaa cagtgacttt gttttttag gctgcatccc atatctatca aaatcaattt 60
gttcaaatga tctcaattc acttattaac aagtcaaaat cttctatgtt ccaagtcaga 120
actttgagag aactgttatg gggctatagg gatccatttt tgagtttggt tccgtaccct 180
gttactacca cagttgggtc gttttatcct gtaagtacca aatatgaatg gcaatattat 240
<;210>; 43
<;211>; 208
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 43
tttgaatttt gtttactgct gtttctttag agttcgtttt ctgccaagg aaaatgtaac 60
ccaggacgct gaggacaaca cagtctcttt cctgcagccc aatggtgcca tcttcgaacc 120
ttcactatca gttggaacag aggctgacaa cttcacagtt ctcaatctgg ctgtggcagt 180
gagtagacaa acaacaaagt tatctatt 208
<;210>; 44
<;211>; 221
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 44
cataacccaa acttattttc ttttccatag caagttgtcc tcgaagaagg tacaattgct 60
tttaaaaatt gggttaaaac aggacagaa gtttacagac agttttggat ctttgatgtg 120
caaaatccac aggaagtgat gatgaacagc agcaacattc aagttaagca aagaggtcct 180
tatacgtaca ggtgagtgag tgcccacaaa tatgagacac t 221

```

フロントページの続き

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA35 DA12 DA13 FB01
 FB02 FB03 FB04 FB07 FB08
 GC10
 4B024 AA11 CA03 CA09 DA06 GA25
 HA12
 4B063 QA01 QA07 QA08 QA13 QA17
 QA19 QQ12 QQ43 QR38 QR56
 QR62 QS25 QS34